

REC'D 22 JUN 2004

WIPO

PCT

Rec'd PCT/PCT 13. JUN 2005

# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: Invenzione Industriale  
N. MI2003 A 001015



Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'acchiuso processo verbale di deposito.

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

31 MAG. 2004

oma, II .....



IL FUNZIONARIO  
Ing. DI CARLO

BEST AVAILABLE COPY

PCT/E P 200606 5157

07.06.04



AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE. DEPOSITO RISERVE. ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione NAXOSPHARMA S.R.L.

Residenza 20020 CESATE (MI)

codice 039536100655 N.G.

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome  cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

via  città  cap  (prov)

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario NAXOSPHARMA SRL  
via XVI STIRIA 22 città CESATE cap 20020 (prov) MI

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl)

gruppo/sottogruppo

Poli-(amminopirrolcarbossammidi) per uso nella profilassi e nel trattamento delle endoparassitosi  
animali e loro composizioni con ciclodestrine.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI  NO

SE ISTANZA: DATA / /  N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) LOMBARDI Paolo

3)

2)

4)

F. PRIORITÀ

azione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOLIMENTO RISERVE
1) <u></u>	<u></u>	<u></u>	<u></u>	<u></u>	Data <u></u> N° Protocollo <u></u>
2) <u></u>	<u></u>	<u></u>	<u></u>	<u></u>	<u></u>

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI. denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) <u>2</u>	<u>PROV</u>	<u>n. pag. 20</u>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) .....	SCIOLIMENTO RISERVE
Doc. 2) <u>Q</u>	<u>PROV</u>	<u>n. tav. 00</u>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) .....	Data <u></u> N° Protocollo <u></u>
Doc. 3) <u>Q</u>	<u>RIS</u>		lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale .....	<u></u>
Doc. 4) <u>Q</u>	<u>RIS</u>		designazione inventore .....	<u></u>
Doc. 5) <u>Q</u>	<u>RIS</u>		documenti di priorità con traduzione in italiano .....	<u></u>
Doc. 6) <u>Q</u>	<u>RIS</u>		autorizzazione o atto di cessione .....	<u></u>
Doc. 7) <u>Q</u>			nominativo completo del richiedente .....	<u></u>

8) attestato di versamento, totale Euro 100

9) compilato il 20/05/2003 Firma del (i) richiedente (i) Paolo Lombardi rapp. legale di NAXOSPHARMA S.R.L.

10) continua sì/no NO

11) del presente atto si richiede copia autentica sì/no NO

CAMERA DI COMMERCIO IND. E AGR. DI MILANO MILANO  
VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MI2003A 001015 Reg. A.

codice 15

L'anno 2003 il giorno 20 del mese di MAGGIO

Il (i) richiedente (i) sopraindicato (i) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 100 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopriportato.

12) ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO E SCHEMI E DISCUSSIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

REG. A

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

DATA DI RILASCIO

20 05 2003

[REDACTED]

[REDACTED]

## D. TITOLO

Poli-(amminopirrolcarbossammidi) per uso nella profilassi e nel trattamento delle endoparassitosi animali e loro composizioni con ciclodestrine.

## L. RIASSUNTO

Uso di distamicina e suoi analoghi e/o derivati poli-(amminopirrolcarbossammidici) nella preparazione di una composizione farmaceutica avente attività contro le endoparassitosi negli animali.

## M. DISEGNO



Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

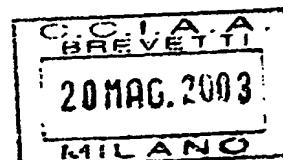
"POLI-(AMMINOPIRROLCARBOSSAMMIDI) PER USO NELLA PROFILASSI  
E NEL TRATTAMENTO DELLE ENDOPARASSITOSI ANIMALI E LORO  
COMPOSIZIONI CON CICLODESTRINE" M 2015

5 Titolare: NAXOSPHARMA s.r.l., con sede in 20020 CESATE, via XVI Strada 22

Inventore designato: Paolo LOMBARDI

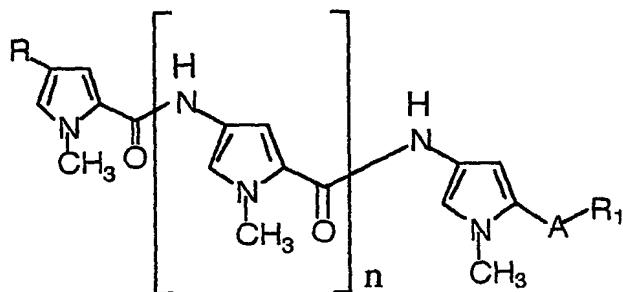
Depositata il: con il N.

\*\*\*



SFONDO DELL' INVENZIONE

10 La presente invenzione riguarda l'uso di un composto avente la seguente formula (I):



I

15

dove:

n è 0 o un numero intero compreso tra 1 e 5;

R è un gruppo R<sub>2</sub>-X -C(=Z)-NH-, in cui X rappresenta un legame chimico o un radicale aromatico o eteroaromatico, Z è ossigeno o il gruppo NH, e:

20 se X è un legame chimico, R<sub>2</sub> è idrogeno, alchile, dialchilamminoalchile, alchenile, cicloalchile, arilalchile, arilalchenile, aloalchile, o un radicale aromatico o eteroaromatico;

se X è un radicale aromatico o eteroaromatico, R<sub>2</sub> è nitro, ammino o formilammino;

oppure:

25 R è un gruppo R<sub>3</sub>-C(=Z)-, dove Z è ossigeno o il gruppo NH, e R<sub>3</sub> è idrogeno, il gruppo

-OR<sub>4</sub> o -NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, dove:

R<sub>4</sub> è scelto nel gruppo rappresentato da idrogeno, un radicale alchile, cicloalchile, arilalchile, aromatico;

R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub>, uguali o differenti, sono scelti nel gruppo rappresentato da:

5 idrogeno, un radicale alchile, cicloalchile, aromatico, arilalchile, eterociclico, possibilmente sostituito con un gruppo formammido o carbamoile, o

R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub>, legati insieme, formano una catena alchilenilica o un gruppo

-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- o un gruppo -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-;

A rappresenta un legame chimico o il gruppo -CO-NH-Y, dove Y è un residuo alchilenile 10 o aromatico;

R<sub>1</sub> è -COOR<sub>4</sub>, -B-NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, -C(=NH)-NH<sub>2</sub>, un residuo eterociclico contenente azoto dove:

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub> sono come precedentemente definiti, B rappresenta un legame chimico o il gruppo -C=O, e:

15 quando R<sub>1</sub> è -B-NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, e B è un legame chimico, oppure quando R<sub>1</sub> è un residuo eterociclico, A non è un legame chimico;

o un suo sale farmaceuticamente accettabile nella preparazione di una composizione farmaceutica con attività contro le endoparassitosi negli animali.

Quando: n è 1, e R rappresenta il gruppo R<sub>2</sub>-X -C(=Z)-NH-, in cui X è un legame chimico, R<sub>2</sub> è idrogeno e Z è ossigeno, e A rappresenta il gruppo -CO-NH-Y, in cui Y è -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- e R<sub>1</sub> rappresenta -C(=NH)-NH<sub>2</sub>, il composto di formula (I) è il ben noto antibiotico antivirale Distamicina, isolato e prodotto dal micelio dello *Streptomyces distallicus* [A.M. Casazza et al., *Antimicrobial Agents Chemother*, 5:593 (1965)]. I composti di formula generale (I) sono composti noti la cui preparazione è stata descritta [F. Arcamone, et al., *Gazz. Chim. Ital.* 97:1110 (1967); G. DiPietro et al., *Perkin Comm.*,

PR

1996:1333; P. Lombardi et al., *Pharmacol. Ther.*, 76:125 (1997); F. Animati et al., *J. Med. Chem.*, 38:1140 (1995); WO 9209574; US 5472976; US 5670534] e per i quali vengono genericamente menzionate attività farmacologiche di vario tipo, ad esempio attività antivirali e antimalariche, le quali tuttavia non hanno trovato applicazione nella pratica clinica. Nell'arte precedente non vi è in alcun modo indicata una specifica attività dei composti secondo l'invenzione nel trattamento delle endoparassitosi degli animali o un loro uso in medicina veterinaria.

Le composizioni farmaceutiche, in accordo con l'invenzione, contengono come principio attivo un composto di formula (I), o un suo sale farmaceuticamente accettabile, come sotto definito, ed un diluente e/o veicolante farmaceuticamente accettabile.

Oggetto della presente invenzione è in particolare l'uso di un composto di formula (I), o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, in associazione o combinazione con ciclodestrina nella preparazione di una composizione farmaceutica veterinaria con attività contro le endoparassitosi negli animali.

15

#### AREA DELL' INVENZIONE

Sarebbe altamente auspicabile realizzare ulteriori progressi al fine di ottenere trattamenti più efficaci, ed esenti da effetti collaterali non desiderati, contro le numerosissime parassitosi animali. Per diverse delle quali, infatti, non esiste ancora una terapia soddisfacente, sia per la mancanza di farmaci ad azione specifica, sia a seguito dello svilupparsi di fenomeni di resistenza ai farmaci in uso ed il verificarsi di forme di ridotta difesa immunitaria nei pazienti, sia per la straordinaria resistenza dei parassiti alle più svariate condizioni ambientali, includenti i composti chimici di norma utilizzati per le disinfezioni.

I parassiti sono patogeni per definizione, provocando costantemente danni all'organismo ospite, che possono risultare più o meno consistenti in relazione alla

PR

patogenicità dei parassiti, al loro numero e alle capacità reattive dell'ospite, provocando malattie che sono spesso a decorso cronico. Inoltre, i parassiti favoriscono l'insorgenza di altri agenti patogeni con aggravio di conseguenze, in quanto le modificazioni causate dal parassita possono fungere da fattore favorente il possibile impianto di altri microorganismi patogeni. Gli animali affetti da parassitosi, pertanto, quando non in diretto pericolo di morte, risultano fortemente debilitati o comunque assumono comportamenti non normali.

Nel caso di animali da produzione o da reddito, ciò si riflette in una diminuzione della quantità e qualità dei prodotti (carne, latte, lana e loro derivati) con conseguenti significative perdite economiche per gli allevatori, per i produttori ed eventuali conseguenze sanitarie per i consumatori.

Al riguardo, le infezioni da parassiti hanno assunto negli ultimi anni caratteri di gravità in zootecnia, in quanto divenute patologie emergenti a seguito delle nuove tecniche di intensificazioni delle produzioni, del management aziendale e delle spinte al miglioramento genetico.

In queste condizioni, infatti, la natura opportunistica tipica dei parassiti riesce ad espandere il proprio potenziale patogeno in quanto l'aumento del tasso di trasmissione tra soggetto e soggetto (particolarmente elevato in ambienti confinati ad alta densità dove gli animali sono stabulati anche in modo permanente) e la diminuzione della efficienza della risposta immunitaria (legata a una serie di fattori condizionanti che caratterizzano l'allevamento intensivo) permettono la rapida replicazione e diffusione del parassita, arrivando a determinare in alcuni allevamenti prevalenze di infestazione molto elevate, costituendo una minaccia perpetua alla salute dell'animale e alla produttività.

In questo contesto, le endoparassitosi e, in particolare, quelle sostenute dai parassiti unicellulari enteropatogeni, sono oggetto di maggiore interesse nella pratica e ricerca medica veterinaria sia per le caratteristiche di infettività, morbilità e mortalità nei diversi



YU

ospiti, sia per la vasta diffusione e capacità di sostenere gravi infezioni di carattere zoonosico che possono determinare la morte nei soggetti immunocompromessi. Inoltre, per molti degli agenti causanti la mancanza di specificità d'ospite fa sì che le vie di trasmissione siano numerose e di fatto non controllabili sia nei riguardi degli animali che dell'uomo: una stessa specie parassita può essere osservata in decine di specie di animali di allevamento, di compagnia o selvatici, e a diffusione planetaria.

5 Patologie a carattere parassitario importanti od emergenti sono, ad esempio:

le Tricomoniasi, che affliggono i volatili (tacchino, pollo, ecc.) sostenute da *T. gallinae* e *T. gallinarum*, e le infezioni da *Hexamita meleagridis*, che colonizzano i tratti 10 superiori dell'apparato digerente e distale dell'intestino;

le Giardiasi, ad ampia diffusione geografica e potenzialmente presenti in tutti gli animali, indotte da parassiti di cui i più comuni sono *G. lamblia* o *G. enterica*, *G. canis*, *G. cati*, *G. bovis*, *G. duodenalis*, *G. chinchillae* (particolarmente grave per gli allevamenti di cincillà), *G. intestinalis*, localizzati a livello del duodeno e del colon;

15 le Istomoniasi o enteropatiti infettive, sostenute da *Histomonas meleagridis*, che si localizza nell'intestino cieco dei volatili, principalmente tacchini;

le Amebiasi, provocate da parassiti del genere *Entamoeba*, come ad esempio *E. histolytica*, localizzato nel grosso intestino (cieco e colon), che affligge particolarmente l'uomo, ma può essere diffusamente presente negli animali, i quali costituiscono dei 20 serbatoi di infezione per l'uomo;

le Coccidiosi, in grado di svilupparsi in quasi tutti gli animali domestici e selvatici ed anche nell'uomo, ad ampia diffusione geografica ed anche a livello endemico, sostenute da famiglie composte da numerosi parassiti a localizzazione intestinale, come le specie appartenenti al genere *Eimeria*, ad esempio, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis*, *E. necatrix*, *E. tenella*, *E. stiedae*, *E. alabamensis*, *E. perforans*, e *E. zuernii*; le specie appartenenti al

genere Isospora, ad esempio, *I. hominis*, *I. belli*, *I. bigemina*, *I. rivolta*, *I. felis*; le speci appartenenti al genere Cryptosporidium, ad esempio, *C. parvum*, *C. muris*, *C. bailey*, *C. felis*, *C. canis*, *C. meleagridis*, *C. nasorum*, *C. serpentis*, *C. wrairi*, *C. andersoni*, *C. blagburni*, *C. saurophilum*, *C. molnari*;

5 le Balantidiosi, causate da *Balantidium coli*, localizzato nel grosso intestino, principalmente nei suini, ma anche nei bovini e nell'uomo.

Come conseguenza delle moderne tecniche di indagine, nuovi aspetti di polimorfismo genetico dei succitati parassiti sono continuamente scoperti e nuove riclassificazioni sono proposte, per cui le speci parassitarie indicate sono solamente indicative e soggette ad 10 aumentare.

Nonostante molti agenti chemioterapici siano stati saggiati per la loro efficacia contro i parassiti enteropatogeni negli animali, a tutt'oggi non esistono composti per la profilassi o la terapia che siano chiaramente identificati, largamente accettati o immediatamente disponibili. Alcuni farmaci hanno dimostrato migliorare solo in parte la sintomatologia e il 15 tasso di mortalità all'interno dell'allevamento, altri si sono rivelati tossici per l'animale alla dose terapeuticamente efficace.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL' INVENZIONE

E' stato ora trovato che i composti di formula (I) secondo la presente invenzione, oltre che ad esibire attività antivirali ed antimalariche, esibiscono sorprendentemente in 20 vario grado, e in funzione dei differenti sostituenti, attività antiparassitaria in vitro e in vivo nei confronti dei parassiti interni che affliggono gli animali, particolarmente nei confronti dei parassiti locati nel tratto gastrointestinale (parassiti enteropatogeni), agenti causanti di varie e a volte gravi infezioni enteriche ed enteriti, come indicato più sopra.

La solubilità in acqua dei sali farmaceuticamente accettabili dei composti di formula 25 (I) e la sorprendente non assorbibilità per via orale, che li rende innoqui e non tossici nei

confronti dell'animale ospite, permettono ai composti della presente invenzione di svolgere l'azione terapeutica e profilattica richiesta contro i parassiti indicati, sia per i casi di infezione acuta sia per i casi in cui sia necessario tenere sotto controllo la popolazione parassitaria in situazione sicura nei confronti degli animali infetti.

5 E' noto, infatti, come gli animali malati spesso rifiutino il cibo, ma raramente rinunciano a bere. E' noto altresì come molti farmaci in uso nel campo veterinario, e in particolare quelli utilizzati per il controllo dei parassiti, possano rinvenirsi come tali, o comunque come metaboliti derivati, nei prodotti dell'animale destinati al consumo umano (carni, latte).

10 I composti della presente invenzione, pertanto, esibiscono un notevole vantaggio applicativo rispetto a molti dei farmaci dell'arte precedente in quanto possono venire somministrati disciolti nell'acqua da bere, e non essendo assorbiti dall'ospite dopo somministrazione per via orale, non si diffondono nei tessuti dell'animale ospite né tantomeno vengono qui metabolizzati.

15 I sali farmaceuticamente accettabili dei composti di formula (I) sono sia i sali con acidi inorganici farmaceuticamente accettabili, ad esempio acido cloridrico, solforico, fosforico, che i sali con acidi organici farmaceuticamente accettabili, ad esempio acido acetico, maleico, ascorbico, succinico, benzoico e salicilico. Particolarmente preferiti sono i sali con acido cloridrico.

20 Esempi preferiti di composti secondo la presente invenzione sono:

la distamicina; e i composti di formula (I) dove:

n è definito come sopra;

R è il gruppo  $-\text{CONH}_2$ , A è il gruppo  $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2-$ , R<sub>1</sub> è il gruppo  $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$  oppure il gruppo  $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ;

25 R è il gruppo  $-\text{NH}-\text{CH}(=\text{NH})$ , A è il gruppo  $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2-$ , R<sub>1</sub> è il gruppo

Ver

-C(=NH)-NH<sub>2</sub> oppure il gruppo -CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oppure il gruppo -CONH<sub>2</sub>;  
e i loro sali farmaceuticamente accettabili.

I composti di formula (I) risultano esibire attività citotossica specifica in vitro e in vivo nei confronti degli enteroparassiti succitati, come riportato in Esempio 1 e in 5 Esempio 2, a titolo esplicativo ma non limitativo.

I composti di formula (I), inoltre, non risultano essere assorbiti per via orale, come si riporta in Esempio 3 dove, a titolo esplicativo ma non limitativo, si descrive uno studio col quale si confronta le concentrazioni ematiche nel ratto a seguito di somministrazione endovenosa (i.v.) e, rispettivamente, di somministrazione orale (p.o.).

10 La composizione farmaceutica dell'invenzione trova pertanto utile applicazione nella profilassi e nel trattamento terapeutico delle endoparassitosi negli animali, particolarmente gli animali da produzione e da reddito, sia i mammiferi, come bovini, ovini, caprini, suini ed equini, che i non mammiferi, come polli, tacchini, piccioni, anatre, oche, quaglie, fagiani, e gli animali da compagnia, come cane, gatto, uccelli da voliera.

15 Esempi preferiti di enteropatie da parassiti che possono essere prevenute o trattate con la composizione farmaceutica dell'invenzione sono le Tricomoniasi, le Giardiasi, le Istomoniasi, le Amebiasi, le Coccidiosi e le Balantidiosi.

20 La composizione farmaceutica dell'invenzione è preferibilmente somministrata nell'animale per via orale, ad esempio disciolta nell'acqua da bere o mescolata col cibo o mangime.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è un metodo di trattamento di endoparassitosi nell'animale, in bisogno di tale trattamento, comprendente la somministrazione per via orale di una quantità terapeuticamente efficace di un composto di formula (I), o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

25 I composti secondo l'invenzione possono essere somministrati in varie forme orali



solide o non, ad esempio come compresse, capsule, compresse rivestite di films o zucchero, soluzioni o sospensioni, preferibilmente come soluzioni, preferibilmente discolti in acqua.

Il dosaggio dipende dall'età, peso, condizione, specie dell'animale e dal metodo di somministrazione, ad esempio se orale in forma di bolo, dispersione nell'acqua da bere o nei mangimi. Per esempio, una dose effettiva per un animale adulto può essere compresa tra 0,1 e 500 mg/kg somministrata da 1 a 5 volte al giorno, oppure una concentrazione compresa tra 0,5 e 5 g per litro di acqua da bere o un tenore compreso tra 1 e 10 g per kilo di mangime. Ad ogni modo la scelta della dose è lasciata al veterinario.

Le composizioni farmaceutiche contenenti i composti dell'invenzione sono preparate seguendo le tecniche convenzionali. Le forme solide possono contenere, ad esempio, unitamente al principio attivo, diluenti come lattosio, destrosio, saccarosio, cellulosa, amido di cereali o patate; lubrificanti come silice, talco, acido stearico, stearato di calcio o di magnesio e/o glicoli polietilenici; agenti leganti come amidi, gomma arabica, gelatina, metilcellulosa, carbossimetilcellulosa o polivinilpirrolidone; agenti disgreganti come amido, acido alginico, alginati o amidi, sodio glicolati; coloranti, dolcificanti, agenti bagnanti come lecitina, polisorbati, laurilsolfati; ed in generale le sostanze non tossiche e farmaceuticamente inattive comunemente usate nelle formulazioni farmaceutiche. Tali preparazioni farmaceutiche possono essere preparate secondo modalità note, ad esempio con processi di mescolamento, granulazione, compressione, rivestimento. Le dispersioni liquide possono essere ad esempio sciroppi, soluzioni, emulsioni e sospensioni. Gli sciroppi e le soluzioni possono contenere come vettori, ad esempio, saccarosio, glicerina, mannitol, sorbitolo. Le sospensioni e le emulsioni possono contenere come vettore, ad esempio, una gomma, agar, alginato di sodio, pectina, metilcellulosa, carbossimetilcellulosa, alcool polivinilico.

V.L.

Un ulteriore specifico oggetto della presente invenzione è anche una composizione farmaceutica comprendente un composto secondo l'invenzione in associazione e/o combinazione con una ciclodestrina. Le ciclodestrine (di qui in poi indicate come CD) sono oligosaccaridi ciclici ben noti, formati da resti di D-glucosio, aventi una cavità cilindrica capace di includere varie molecole (molecole-ospiti). Una delle più interessanti proprietà delle CD è, infatti, la loro capacità di formare composti di inclusione o complessi. Questo tipo di complessazione conferisce nuove proprietà chimico-fisiche alle molecole-ospiti, ed è pertanto estensivamente sfruttato nel settore farmaceutico per aumentare la solubilità e la stabilità di sostanze farmacologicamente attive (O. Beckers et al., Drug Dev. Ind. Pharm., 17:1503 (1991); J. Szejli, Pharm. Tech. Int., February 1991: 15) e, come conseguenza, le loro caratteristiche di dissoluzione e biodisponibilità.

Generalmente tali complessi di inclusione si preparano in un mezzo liquido, acqua o miscele con solventi organici, ed ottenuti come polveri dopo essicamento.

Sono noti nell'arte diversi metodi per preparare composti solidi di inclusione, come il metodo dell'impasto (K. Uekama et al., Int. J. Pharm., 10:1 (1982)); della coprecipitazione (K. Uekama et al., Int. J. Pharm., 16:327 (1983)); dello spray-drying (H.P.R. Bootsma et al., Int. J. Pharm., 51:213 (1989); del freeze-drying (US 4603123). In alcuni casi la formazione del complesso nella fase solida è termodinamicamente spontanea e l'inclusione può essere ottenuta per semplice macinazione (C. Torricelli et al., Int. J. Pharm., 71:19 (1991)).

E' inoltre noto che l'efficacia di certi farmaci può essere ulteriormente migliorata con CD anche nel caso di molecole altamente solubili in acqua (come i sali farmaceuticamente accettabili dei composti secondo l'invenzione) le quali teoricamente non avrebbero bisogno di alcuna particolare formulazione intesa ad aumentare la loro solubilità o la loro velocità di dissoluzione (US 5712260).

PL

Nel presente oggetto ci si riferisce generalmente all'uso di ogni CD, naturali ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD), sintetiche o semi-sintetiche (come per esempio idrossipropil- $\beta$ -CD o dimetil- $\beta$ -CD). In particolare, CD preferite sono la  $\beta$ -cyclodestrina, la idrossipropil- $\beta$ -cyclodestrina e la  $\gamma$ -cyclodestrina.

5 E' stato sorprendentemente trovato che quando i sali farmaceuticamente accettabili dei composti di formula (I) sono mescolati con cyclodestrine, la solubilità dei composti secondo l'invenzione non cambia in modo apprezzabile, ma gli effetti della riprecitazione indotta sui composti di formula (I) da speci anioniche o da aumento del pH risultano essere insignificanti, in quanto le CD sono in grado di mascherare il sito di interazione dei  
10 composti di formula (I).

La formazione di un complesso in soluzione tra i composti di formula (I) ed una appropriata cyclodestrina può evitare, quindi, l'eventuale riprecipitazione dei composti di formula (I) come basi libere o come sali insolubili in condizioni fisiologiche. Questo fenomeno può risultare in un grande vantaggio per la somministrazione per via orale dei  
15 composti secondo l'invenzione, in quanto la loro efficacia antiparassitaria non viene influenzata dagli ambienti del tratto gastroenterico (stomaco, intestino) e dalle loro condizioni particolari (pH, presenza di speci anioniche che possono formare complessi insolubili con i composti dell'invenzione, assunzione o meno di cibo durante il trattamento).

20 Inoltre, si è notato che non è necessario formare il complesso tra un composto di formula (I) e la CD nello stato solido, ma è sufficiente somministrare una semplice miscela fisica delle due entità chimiche, cioè una loro combinazione o associazione.

La proporzione tra un composto di formula (I) e una CD può variare, ad esempio, da 1:0,5 a 1:10 come rapporto molare, preferibilmente da 1:1 a 1:4.

25 E' pertanto oggetto della presente invenzione anche una formulazione farmaceutica

contenente un composto di formula (I), o un suo sale farmaceuticamente accettabile , in associazione e/o combinazione con una CD, che può essere preparata secondo procedure note e convenzionali.

E' altresì specifico oggetto della presente invenzione un metodo di trattamento di 5 endoparassitosi nell'animale, che comprende la somministrazione per via orale di una composizione contenente una quantità terapeuticamente efficace di un composto di formula (I), o un suo sale farmaceuticamente accettabile , in associazione e/o combinazione con una CD.

I seguenti Esempi intendono illustrare, senza limitare l'invenzione.

10

#### ESEMPIO 1

Attività in vitro. Culture di cellule CACO2 ( $2 \times 10^6$  cellule, 70% confluenti) sono state inoculate con sporozoiti purificati di *C. parvum* e, al momento dell'inoculo, trattate con concentrazioni variabili del composto di formula (I, R = -COONH<sub>2</sub>, A = -CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub> = -C(=NH)-NH<sub>2</sub>) come cloridrato disiolto in dimetilsolfossido (DMSO) e con DMSO (5% del mezzo) nei controlli. Dopo 30 minuti il composto in 15 esame è stato allontanato con ripetuti lavaggi. La percentuale delle cellule infettate è stata determinata dopo 24 ore dall'inizio dell'esperimento per esame microscopico dopo colorazione secondo Giemsa, analizzando 10 campi microscopici per ogni punto sperimentale con ingrandimento x400. I valori ottenuti per ogni punto rappresentano la 20 media di tre repliche indipendenti. La percentuale delle cellule infettate nei controlli trattati con DMSO è stata del 7,1% per l'Esperimento 1, e del 6,3% per l'Esperimento 2. I risultati riportati in Figura 1 mostrano una notevole attività citotossica del composto in esame nei confronti del parassita in oggetto.

25

#### ESEMPIO 2

Attività in vivo. L'attività antiparassitaria in vivo per via orale del composto



W

formula (I, R = -COONH<sub>2</sub>, A = -CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub> = -C(=NH)-NH<sub>2</sub>) è stata determinata valutando la capacità del composto di modificare il corso di infezione indotta sperimentalmente in topi BALB/C immunocompromessi. Dopo parecchie settimane di trattamento immunosoppressivo con dexametasone, 30 topi sono stati infettati nel 5 medesimo giorno tramite somministrazione orale di oocisti di *C. parvum*. Due settimane dopo l'infezione, i topi diagnosticati infetti dalla presenza di oocisti del parassita nelle feci, determinata sia col metodo di Zeil Niessel che con quello dell'immunofluorescenza, sono stati suddivisi in 3 gruppi di 5 animali ciascuno. Due gruppi di topi sono stati trattati col composto in esame sciogliendo il composto come cloridrato nell'acqua da bere alla 10 concentrazione di 5 µg/ml (si è stimato che i topi bevano da 2 a 5 ml di acqua al giorno), mentre il terzo gruppo (controllo) non ha ricevuto alcun trattamento. Allo scopo di valutare l'efficacia del trattamento, la presenza dei parassiti nelle feci è stata monitorata per ulteriori 4 settimane. Gli animali sottoposti al trattamento hanno mostrato una 15 marcata riduzione nel numero di oocisti nelle feci dopo una settimana e la totale scomparsa delle oocisti dopo 2 settimane, che si è mantenuta per ulteriori 4 settimane durante le quali il trattamento era stato sospeso.

### ESEMPIO 3

10 ratti Sprague-Dawley del peso di 320-390 g sono stati usati allo scopo di determinare i livelli plasmatici del composto di formula (I, R = -COONH<sub>2</sub>, A = -CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub> = -C(=NH)-NH<sub>2</sub>) dopo somministrazione per via endovenosa e, 20 rispettivamente, per via orale. I ratti, dopo anestesia, sono stati incannulati alla vena giugulare destra e la cannula lasciata esposta per permettere la somministrazione del farmaco e il prelievo dei campioni di sangue. Il trattamento è stato iniziato dopo 24-48 ore dal risveglio dall'anestesia.

25 Somministrazione endovenosa (10 mg/kg). 10 mg del cloridrato del composto in esame

sono stati disiolti in un veicolo costituito da DMSO e salina (1 : 20 v/v) ad una concentrazione di 5 mg/ml. Il volume somministrato è stato di 2 ml/kg come bolo.

Somministrazione orale (20 mg/kg). 20 mg del cloridrato del composto in esame sono stati disiolti in un veicolo costituito da DMSO e salina (1 : 250 v/v) ad una concentrazione di 4 mg/ml. Il volume somministrato è stato di 5 ml/kg.

Prelievi. Campioni di sangue (400-500  $\mu$ l) sono stati prelevati dalla vena giugulare ad intervalli di 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 680 e 1440 minuti dopo la somministrazione endovenosa e, rispettivamente, orale del farmaco. La quantità di sangue prelevata è stata rimpiazzata da un uguale volume di salina.

Livelli plasmatici. La determinazione dei livelli ematici del composto in esame è stata condotta con una metodica HPLC validata. Il limite quantitativo dell'analisi era di 0,1  $\mu$ g/0,5 ml.

Dopo una singola somministrazione endovenosa di 10 mg/kg del farmaco, la concentrazione del prodotto nel sangue è risultata secondo un profilo biesponenziale.

Dopo una singola somministrazione per via orale di 20 mg/kg del farmaco, nessuna quantità determinabile del composto è stata trovata nel sangue nell'intervallo 0 - 1440 minuti, indicando che il composto non è assorbibile per via orale. I dati sono riportati nella Figura 2.

#### ESEMPIO 4

0,15 mmoli del cloridrato di un composto di formula (I) e 0,38 mmoli di  $\beta$ -ciclodestrina sono disiolte in 100 ml di acqua sotto agitazione per 6 ore. Il prodotto viene separato per precipitazione raffreddando la soluzione a 3°C o, alternativamente, sottoponendo la soluzione a processo di freeze-drying.

#### ESEMPIO 5

2,64 mmoli di  $\beta$ -ciclodestrina sono disiolte in 100 ml di acqua riscaldando

NL

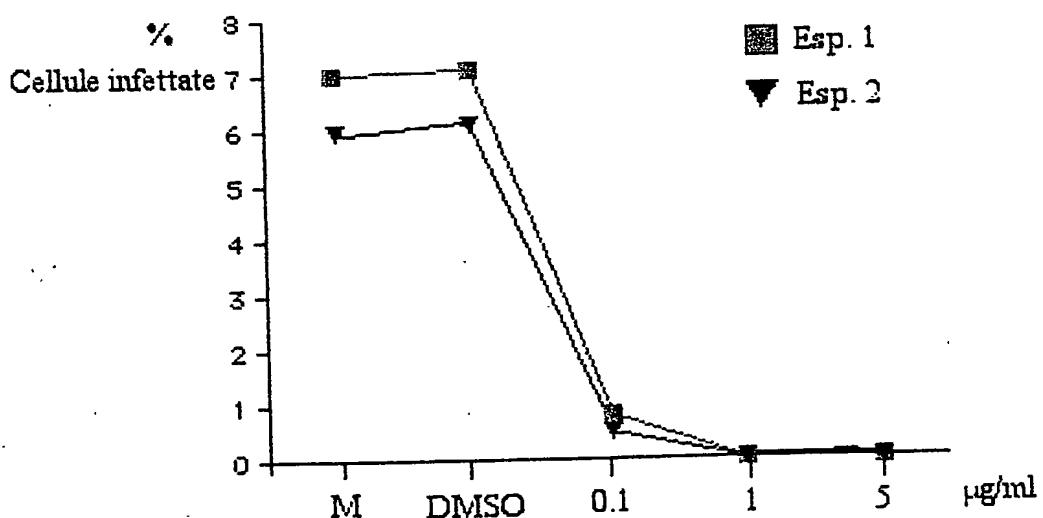
leggermente. Alla soluzione risultante si aggiungono 1,06 mmoli del cloridrato di un composto di formula (I) e si agita per 6-12 ore. Il prodotto viene separato per precipitazione raffreddando la soluzione a 3°C o, alternativamente, sottponendo la soluzione a processo di freeze-drying.

5 ESEMPIO 6

Miscele del cloridrato di un composto di formula (I) e di differenti quantità di  $\beta$ -ciclodestrina, o 2-idrossipropil- $\beta$ -ciclodestrina, o  $\gamma$ -ciclodestrina vengono preparate per macinazione dei componenti, vaglio al setaccio (< 0,375 mm) e agitazione in un turbo-mixer per 10 min.

10

15 FIGURA 1



## **FIGURA 2**

min	s.v.	( $\mu$ g/ml)	p.o.
0		nd	nd
5	10.0	$\pm$ 0.95	nd
15	8.2	$\pm$ 0.98	nd
30	6.9	$\pm$ 0.67	nd
60	5.2	$\pm$ 0.65	nd
90	3.8	$\pm$ 0.59	nd
120	2.7	$\pm$ 0.74	nd
180	1.5	$\pm$ 0.44	nd
240	1.1	$\pm$ 0.21	nd
360	0.89	$\pm$ 0.15	nd
480	0.72	$\pm$ 0.09	nd
680	0.53	$\pm$ 0.16	nd
1440	0.27	$\pm$ 0.11	nd

5

10

15

20

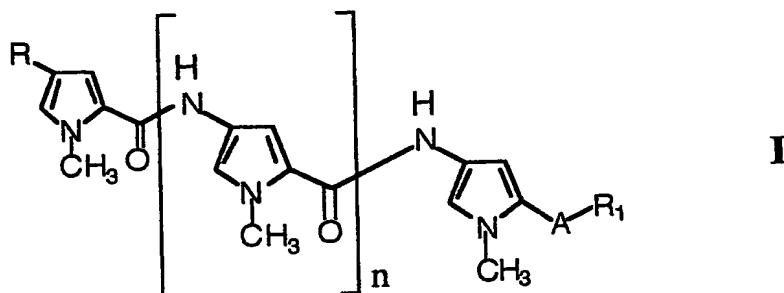
25



WL

RIVENDICAZIONI

1. Uso di un composto avente la seguente formula (I):



dove:

10 n è 0 o un numero intero compreso tra 1 e 5;

R è un gruppo  $R_2X-C(=Z)-NH-$ , in cui X rappresenta un legame chimico o un radicale aromatico o eteroaromatico, Z è ossigeno o il gruppo NH, e:

15 se X è un legame chimico,  $R_2$  è idrogeno, alchile, dialchilamminoalchile, alchenile, cicloalchile, arilalchile, arilalchenile, aloalchile, o un radicale aromatico o eteroaromatico;

se X è un radicale aromatico o eteroaromatico,  $R_2$  è nitro, ammino o formilammino;

20 R è un gruppo  $R_3C(=Z)-$ , dove Z è ossigeno o il gruppo NH, e  $R_3$  è idrogeno, il gruppo  $-OR_4$  o  $-NR_5R_6$ , dove:

R<sub>4</sub> è scelto nel gruppo rappresentato da idrogeno, un radicale alchile, cicloalchile, arilalchile, aromatico;

R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub>, uguali o differenti, sono scelti nel gruppo rappresentato da: idrogeno, un radicale alchile, cicloalchile, aromatico, arilalchile, eterociclico, possibilmente sostituito con un gruppo formammido o carbamoile, o

25 R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub>, legati insieme, formano una catena alchilenilica o un gruppo

-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- o un gruppo -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>;

A rappresenta un legame chimico o il gruppo -CO-NH-Y, dove Y è un residuo alchilenile o aromatico;

R<sub>1</sub> è -COOR<sub>4</sub>, -B-NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, -C(=NH)-NH<sub>2</sub>, un residuo eterociclico contenente 5 azoto dove:

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub> sono come precedentemente definiti, B rappresenta un legame chimico o il gruppo -C=O, e:

quando R<sub>1</sub> è -B-NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, e B è un legame chimico, oppure quando R<sub>1</sub> è un residuo eterociclico, A non è un legame chimico;

10 o un suo sale farmaceuticamente accettabile nella preparazione di una composizione farmaceutica avente attività contro le endoparassitosi negli animali.

2. Uso in accordo alla Rivendicazione 1, dove il composto di formula (I) è scelto tra distamicina o un composto di formula (I) dove:

n è definito come sopra;

15 R è il gruppo -CONH<sub>2</sub>, A è il gruppo -CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub> è il gruppo -C(=NH)-NH<sub>2</sub> oppure il gruppo -CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;

D R è il gruppo -NH-CH(=NH), A è il gruppo -CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub> è il gruppo -C(=NH)-NH<sub>2</sub> oppure il gruppo -CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oppure il gruppo -CONH<sub>2</sub>; o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

20 3. Uso in accordo alla Rivendicazione 1, dove la composizione farmaceutica è per l'uso orale.

4. Uso in accordo alla Rivendicazione 1, dove la composizione farmaceutica è per la profilassi e/o trattamento delle endoparassitosi degli animali.

5. Uso in accordo alla Rivendicazione 4, dove la endoparassitosi è scelta tra 25 Tricomoniasi, Giardiasi, Istomoniasi, Amebiasi, Coccidiosi e Balantidiosi.

6. Uso di un composto di formula (I), o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in associazione o combinazione con ciclodestrina nella preparazione di una composizione farmaceutica veterinaria attività contro le endoparassitosi negli animali.
7. Uso in accordo alla Rivendicazione 6, dove la composizione farmaceutica è per l'uso orale.
8. Uso in accordo alla Rivendicazione 6, dove la composizione farmaceutica è per la profilassi e/o trattamento delle endoparassitosi degli animali.

Peel herunter.

10

15

097

20



25

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**